

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**“EFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIBIOFILM DE GEL BIOADHESIVO
A BASE DE EXTRACTO DE *Origanum vulgare* PARA SU APLICACIÓN
TERAPEUTICA EN ODONTOPEDIATRÍA”**

POR

MARICARMEN VACA CHÁVEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

SEPTIEMBRE, 2019

TESIS

**EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIBIOFILM DE GEL BIOADHESIVO A
BASE DE EXTRACTO DE *Origanum vulgare* PARA SU APLICACIÓN
TERAPÉUTICA EN ODONTOPEDIATRÍA**

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

POR

MARICARMEN VACA CHÁVEZ

Dirección de tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis
Directora

Dra. Sonia Martha López Villarreal
Codirector

TESIS

**EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIBIOFILM DE GEL BIOADHESIVO A BASE DE
EXTRACTO DE *Origanum vulgare* PARA SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA EN
ODONTOPEDIATRÍA**

POR

MARICARMEN VACA CHÁVEZ

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Comité de Examen de Tesis

Presidente

Secretario

Vocal

TESIS

**EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIBIOFILM DE GEL BIOADHESIVO A BASE DE
EXTRACTO DE Origanum vulgare PARA SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA EN
ODONTOPEDIATRÍA**

POR

MARICARMEN VACA CHÁVEZ

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Dirección de Tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis.
Directora

Juan Gabriel Baez
Director Externo

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca otorgada.

Al Programa para Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP) 2017.

Al Programa de Apoyo de la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT-UANL 2018) CN 931-19

A la Facultad de Odontología, Dra. María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda y Rosa Isela Sánchez Nájera, por su incondicional apoyo durante su administración, facilitando las instalaciones de Laboratorio de Biología Molecular.

A la Facultad de Medicina y Veterinaria y Zootecnia y la Facultad de Ciencias Biológicas por abrirnos sus puertas para la realización de ese trabajo.

A la Facultad de Ciencias Biológicas Laboratorio de Ciencias de los Alimentos por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A la Maestría de Ciencias Odontológicas en el área de Odontopediatría por permitirme vivir dos años de grandes experiencias inolvidables, enseñanzas y convivencia.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas personas las que han contribuido al proceso y conclusión de proyecto de investigación.

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, por ser mi principal inspirador y por darme la fuerza necesaria para continuar y concluir este proceso en el cuál obtengo uno de los anhelos más grandes de mi vida.

A mi papá, **Rodolfo Vaca Torres**, por su incansable trabajo y sacrificio no solo en estos dos años, sino todos mis años de estudio para poder llegar hasta aquí, se que no fue fácil y aún así jamás dudaste en apoyarme, al contrario, siempre me impulsaste a seguir adelante por más, pero sobre todo gracias por tu amor incondicional y por todas tus enseñanzas, eres el mejor regalo que la vida me pudo dar. Te amo

A mi mamá, **Maricarmen Chávez Felán**, por siempre tener las palabras perfectas para hacer que me levantara y siguiera adelante cuando sentía que ya no podía dar más, para al final hacerme ver que si, efectivamente podía más, mucho más. Gracias porque sin ti no sería la mujer en la que me he convertido hoy, por tu amor y tu apoyo incondicional... Ojalá algún día pueda ser la mitad de todo lo que eres tu. Te amo

A mi hermana, **Renée Vaca Chávez**, gracias por ser mi mejor amiga desde el día en que te conocí, por siempre entender el apoyo que necesitaba y siempre estar ahí, estoy muy orgullosa de la mujer en la que te has convertido y quiero que sepas que he aprendido muchísimo de ti. ¡Dios nos permita seguir cumpliendo cada una de nuestras metas juntas, gracias por tanto! Te amo

A mi novio, **Eduardo Fajardo Losada**, porque jamás me ha faltado tu apoyo y comprensión desde que empezamos nuestro camino juntos, por haberme acompañado en cada paso de estos dos años aguantando lagrimas, risas, estrés, carga de trabajo, siempre con una sonrisa y con las palabras perfectas para hacerme sonreír. ¡Gracias por tanto amor, te amo!

A toda mi familia, **Rita, Victor, Kakey, Tito**, porque a pesar de la distancia física todos estos años me hicieron sentir que estaban conmigo siempre, sin faltar a mis múltiples eventos, graduaciones, titulaciones, ceremonias etc... y siempre estar ahí apoyándome, sin duda todo este camino no podría haber sido tan especial sin todos ustedes. ¡Gracias!

A mi directora de tesis, **Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis**, por su paciencia y por dedicarme tanto tiempo durante la elaboración de este proyecto, por siempre estar ahí cuando algo necesitaba, por haber creído en mi desde el principio y por sus muchísimas enseñanzas en estos dos años, soy la más feliz de haber tenido la oportunidad de tenerla como asesora y poder aprender tanto de usted, la admiro muchísimo es un honor y un orgullo para mi haber sido su tesista. La quiero mucho

A mi coordinadora, **Dra. Marcela Montes Villarreal**, gracias por siempre brindarnos el apoyo necesario para poder seguir adelante con nuestros proyectos de investigación a pesar de la fuerte carga de trabajo del posgrado, por siempre haber estado al pendiente de nosotros y de nuestras necesidades con tanto cariño. La quiero mucho

A la **Dra. Sonia Martha López Villarreal**, mi coordinadora en el primer año de posgrado, excelente doctora, maestra, pero sobre todo gran ser humano. Gracias por enseñarnos tanto en cuanto a odontopediatría, pero estoy segura que muchos de nosotros nos llevamos mucho más que solo teoría y conceptos odontológicos de usted, gracias por ser una maestra tan dedicada para con sus alumnos, una maestra que supo tocar el corazón de cada uno de nosotros, es una persona muy especial para mí... Gracias por tanto, la quiero muchísimo

A la **Dra. Hortencia Quintanilla Arreozola**, por toda su ayuda y apoyo durante estos años, gracias por todas sus enseñanzas.

A **Vicky, Carmen y Cheli**, porque simplemente este posgrado jamás sería igual sin el apoyo de ustedes tres, gracias por su paciencia y por tanta ayuda, por siempre sacarnos una sonrisa como fuera en esos días de exceso de trabajo o de estrés, por el café siempre listo y calentito que nos daba la energía necesaria para seguir y terminar el día. Nadie como ustedes, los quiero muchísimo

A mis amigos que en poco tiempo se convirtieron en mis hermanos, **Valeria, Sergio, Daniel, Monica, Monse**, agradezco que Dios los haya puesto en mi camino, cada experiencia vivida y tantos momentos de alegría y risas con ustedes, hicieron estos dos años más especiales de lo que ya eran para mí. Los amo

A todos mis maestros del posgrado, gracias por darnos todo de ustedes en sus clases y clínicas, me voy llena de lo mejor de cada uno de ustedes, jamás terminaría de agradecerles todo lo que hoy sé gracias a ustedes y su experiencia.

DEDICATORIA

Este proyecto quiero dedicarlo principalmente a Dios,
a mis padres por su amor y trabajo,
a mi hermana Renée que amo
y a Eduardo por su apoyo incondicional siempre.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
DEDICATORIA.....	VIII
LISTA DE TABLAS	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE GRÁFICOS.....	6
NOMENCLATURA.....	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general.....	14
5.2 Objetivos específicos.....	14
6. ANTECEDENTES	15
6.1 Microbiota oral.....	15
6.2 Microorganismo del genero <i>Streptococcus</i>	16
6.2.1 Clasificación de <i>Streptooccus</i>	16
6.3 <i>Streptococcus mutans</i>	17
6.3.1 Clasificación de <i>Streptococcus mutans</i>	17
6.4 <i>Streptococcus sobrinus</i>	18
6.4.1 Taxonomía	18
6.5 Biofilm	18
6.5.1 Clasificación de placa dental	19
6.6 Caries dental	19
6.6.1 Caries de la infancia temprana	20

6.6.2 Diagnóstico de caries dental	20
6.6.3 Clasificación de caries dental	21
6.6.4 Factores microbiológicos asociados a la caries	21
6.7 Control de placa.....	22
6.7.1 Clorhexidina	22
6.8 Fitoterapia	23
6.8.1 Sustancias activas de las plantas	24
6.8.2 Preparación de las plantas	25
6.9 <i>Origanum vulgare</i>	25
6.9.1 Características de <i>Origanum vulgare</i>	26
6.9.2 Comoposición fitoquímica	26
6.10 Método para obtención de extracto por maceración en frio	27
6.11 Método de evaluación <i>In vitro</i> de actividad antimicrobiana	28
6.11.1 Método de difusión en disco (Método de Kirby-Bauer)	28
6.11.2 Concentración mínima inhibitoria por macrodilución	28
6.12 Métodos de caracterización fitoquímica	29
6.13 Método de elaboración de gel bioadhesivo	29
6.14 Método actividad antibiofilm	30
7. MÉTODOLOGÍA	31
7.1 Obtencion del extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> mediante técnica de maceración en frio	31
7.2 Caracterización fitoquímica del extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> mediante pruebas químicas	33
7.3 Identificación de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC	34
7.3.1 Sembrado por aislamiento	35
7.3.2 Tinción de Gram	36
7.3.3 Preparación del inóculo	37
7.4 Determinación del efecto antimicrobiano del extracto de <i>Origanum vulgare</i> mediante diferenciación en agar contra cepas de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC	37

7.5 Identificación de la concentración mínima inhibitoria In vitro del extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i>	39
7.5.1 Elaboración de concentraciones de extracto de <i>Origanum vulgare</i> para prueba mínima inhibitoria	39
7.5.2 Evaluación cualitativa de la concentración mínima inhibitoria por medio de turbidez	40
7.6 Elaboración de gel bioadhesivo	41
7.6.1 Características de un gel ideal	42
7.7 Evaluación antibiofilm de extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> contra cultivo mixto de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i>	42
8. RESULTADOS	45
8.1 Obtención etanólico de <i>Origanum vulgare</i>	45
8.2 Caracterización fitoquímica parcial	46
8.3 Identificación de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC.....	47
8.4 Efecto antimicrobiano de extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i>	47
8.5 Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i>	49
8.5.1 Elaboración de concentraciones de exrtacto de <i>Origanum vulgare</i> para concentración mínima inhibitoria	49
8.5.2 Prueba de concentración mínima inhibitoria por método de macrodilución	50
8.6 Elaboración de gel bioadhesivo con extracto de <i>Origanum vulgare</i>	50
8.7 Efecto antibiofilm de <i>Origanum vulgare</i>	51
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIONES	56
11. LITERATURA CITADA	57
12. PRODUCTOS GENERADOS	64

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Caracterización fitoquímica parcial.....	33
2. Evaluación cualitativa de CMI.....	41
3. Rendimiento de extracto de <i>Origanum vulgare</i>	45
4. Caracterización fitoquímica parcial de <i>Origanum vulgare</i>	46
5. Actividad antimicrobiana de <i>Origanum vulgare</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 27607).....	48
6. Actividad antimicrobiana de <i>Origanum vulgare</i> contra <i>Streptococcus sobrinus</i> (ATCC 27607).....	48
7. CMI de <i>Origanum vulgare</i> contra <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	50
8. Evaluación de CMI mediante turbidez.....	50
9. Absorbancia a 600 nm.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Origanum vulgare</i> seco.....	31
2. Incorporación de etanol.....	32
3. Técnica de maceración en frío.....	32
4. Filtrado de <i>Origanum vulgare</i>	32
5. Esterilizado de asa.....	35
6. Sembrado de bacterias a estría cerrada.....	35
7. Colorantes de tinción de Gram.....	36
8. Fijado de muestra en porta objetos.....	36
9. Tinción de Gram.....	36
10. Turbidez de 0.5 de la escala de McFarland.....	37
11. Extracto de <i>Origanum vulgare</i> y controles positivo y negativo.....	38
12. Método de difusión en disco de Kirby-Bauer.....	38
13. Elaboración de concentraciones para concentración mínima inhibitoria.....	39
14. Elaboración de gel bioadhesivo de <i>Origanum vulgare</i>	42
15. Evaluación antibiofilm de gel bioadhesivo y extracto de <i>Origanum vulgare</i>	44
16. Extracto etanólico líquido de <i>Origanum vulgare</i>	45
17. Gramos de rendimiento de <i>Origanum vulgare</i>	45
18. Rendimiento final.....	45
19. <i>Streptococcus mutans</i> 100x.....	47
20. <i>Streptococcus sobrinus</i> 100x.....	47
21. Diluciones de extracto.....	49
22. Gel bioadhesivo de <i>Origanum vulgare</i>	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Página
1. Actividad antibiofilm de <i>Origanum vulgare</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i>	52
2. Actividad antibiofilm de extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> contra <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i>	52

NOMENCLATURA

g	Gramos
mg	Miligramos
mm	Milímetros
mL	Mililitros
μL	Microlitros
μg	Microgramos
nm	Nanometros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades internacionales
°C	Grados centígrados

RESUMEN

TESISTA: Maricarmen Vaca Chávez

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIBIOFILM DE GEL BIOADHESIVO A BASE DE EXTRACTO DE *Origanum vulgare* PARA SU APLICACIÓN TERAPEUTICA EN ODONTOPEDIATRÍA

Introducción: Los productos de medicina alternativa incluyen hierbas, material herbario, preparaciones herbarias de los cuales se obtienen principios activos naturales y orgánicos. **Objetivo:** determinar efecto antimicrobiano y antibiofilm de *Origanum vulgare* mediante su incorporación en gel bioadhesivo para uso terapéutico en odontopediatría. **Metodología:** Se obtiene extracto etanólico de *Origanum vulgare* mediante maceración en frío, se realizó la caracterización fitoquímica parcial de *Origanum vulgare* por métodos químicos, se evaluó el efecto antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* (ATCC mediante el método Kirby-Bauer por triplicado incubándose por 24 horas a 37 °C, se determinó la concentración mínima inhibitoria mediante método de macrodilución a concentraciones 2%, 1%, .5%, .25%, .12% y se determinó efecto antibiofilm en placa de 96 pozos mediante (Gen5 de Epoch BioTek). **Resultados:** *Origanum vulgare* respondió positivo a la presencia de grupos químicos como esteroides, flavonoides, taninos y cumarinas. *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* presentaron alta sensibilidad al extracto de *Origanum vulgare*, mostrando una acción antimicrobiana alta y un porcentaje de inhibición relativo de 80% para *Streptococcus mutans* y 75% para *Streptococcus sobrinus* en comparación con el control positivo clorhexidina 2% con inhibición del 100%. La CMI correspondió a una concentración de .25% para ambos microorganismos. La prueba antibiofilm demostró que el gel bioadhesivo de *Origanum vulgare* inhibe en un 61% en comparación con el gel de clorhexidina al 2% redujo en un 55%. **Conclusión:** los productos naturales han sido utilizados en México en el área farmacéutica desde el siglo XVI por los Aztecas, este estudio comprueba lo reportado en artículos acerca de actividad antibacteriana y antibiofilm del extracto de *Origanum vulgare*

PALABRAS CLAVE: extractos vegetales, actividad antimicrobiana, *Origanum vulgare*

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

ABSTRACT

TESISTA: Maricarmen Vaca Chávez

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

EFFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIBIOFILM DE GEL BIOADHESIVO A BASE DE EXTRACTO DE *Origanum vulgare* PARA SU APLICACIÓN TERAPEUTICA EN ODONTOPEDIATRÍA

Introduction: Alternative medicine products include herbs, herbal material, herbal preparations from which natural and organic active ingredients are obtained. **Objective:** to determine the possible incorporation of plant extracts in bio adhesive gel for its therapeutic application in pediatric dentistry. **Methodology:** Ethanolic extract of *Origanum vulgare* is obtained by cold maceration, partial phytochemical characterization of *Origanum vulgare* was performed by chemical methods, the antimicrobial effect against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* (ATCC was evaluated by triplicate Kirby-Bauer method incubated for 24 hours at 37. The minimum inhibitory concentration was determined by microdilution method at 2%, 1%, .5%, .25% and .12% concentrations. Antibiofilm effect was determined in 96-well plate by (Gen5 of Epoch BioTek). **Results:** *Origanum vulgare* responded positively to the presence of chemical groups such as sterols, flavonoids, tannins and coumarins. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* showed high sensitivity to the extract of *Origanum vulgare*, showing a high antimicrobial action and a relative inhibition percentage of 80% for *Streptococcus mutans* and 75% for *Streptococcus sobrinus* compared with the positive control chlorhexidine 2% with inhibition of 100%. The MIC corresponded to a concentration of .25% for both microorganisms. The antibiofilm test showed that *Origanum vulgare* bioadhesive gel inhibited by 61% compared to 2% chlorhexidine gel reduced by 55%. **Conclusion:** the natural products have been used in Mexico in the pharmaceutical area since the sixteenth century by the Aztecs, this study verifies the reported in articles about antibacterial and antifungal activity of the extract of *Origanum vulgare*.

KEY WORDS: plant extracts, antimicrobial activity, *Origanum vulgare*

1.- INTRODUCCIÓN

Al nacer, la cavidad oral del bebé se encuentra libre de microorganismos, pero es colonizada en cuestión de unas horas posteriores al parto por una gran cantidad de bacterias incluyendo los *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* los cuales han sido reconocidos como los microorganismos responsables del desarrollo inicial de la enfermedad de la caries dental. Los resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) en el 2015 estimaron que el 64.3% del total de niños y niñas de 3 años que acudían a centros de salud en México ya estaban afectados por caries dental y solo el 25% de niños y adolescentes de 2 a 19 años eran libres de esta enfermedad.

El fármaco más utilizado comúnmente para la eliminación de estos dos microorganismos ha sido la clorhexidina, sin embargo, estudios y alertas de efectos adversos alérgicos han sido reportados. La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos mejor conocido por sus siglas como la FDA en el 2017 reporto reacciones alérgicas poco comunes pero graves con los productos antisépticos tópicos que contienen gluconato de clorhexidina. Es por eso que muchas personas han optado por la herbolaria, a esto se le conoce como el uso extractivo de plantas con propiedades medicinales o sus derivados, los cuales tienen la capacidad de producir fines terapéuticos en el tratamiento de enfermedades. La herbolaria ha sido estudiada y aplicada desde hace muchísimos años por nuestros ancestros y es utilizada por un alto porcentaje de la población mundial según la Organización Mundial de la Salud. Debido a diferentes estudios que han sido realizados, se conoce que existen muchos tipos de especies naturales que poseen propiedades antimicrobianas, es por esto mismo que estas pueden ser el origen de diferentes agentes antimicrobianos naturales eficientes. El *Origanum vulgare* es una planta, la cuál crece de manera silvestre en 24 estados aproximadamente de la República Mexicana, el estado de Chihuahua se encuentra entre los principales productores. Sus hojas son aplicadas en el campo farmacéutico debido a que diferentes estudios han demostrado que *Origanum vulgare* posee propiedades tónicas, antisépticas, diuréticas y antiespasmódicas. Es por todo lo anterior que se evaluó la acción antimicrobiana y el efecto antibiofilm de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

2.- PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La caries dental constituye un sistema de salud pública en México, la caries dental afecta al 95% de los niños menores de 8 años de edad. (Molina et al 2015). La placa dental o biofilm esta constituida por ciertas bacterias que se unen a la estructura del esmalte dental, iniciando así el proceso de caries. La caries dental podría ser prevenida por medio de la mejoría en la educación, es decir, tratar de coscientizar al paciente o al padre del paciente de la importancia de la higiene dental en los niños y el consumo moderado, con horarios de azucares y carbohidratos. Según la Organización Mundial de la Salud, un efecto adverso es llamado a cualquier respuesta a un medicamento que sea perjudicial y no deseada, esto es una de las principales problemáticas con ciertos fármacos, como ya sabemos además de producir un beneficio en la condición tratada tambien se puede llegar a provocar ciertos efectos secundarios indeseados, diferentes estudios nos muestran que dichas reacciones se presentan entre un 10% a 20%. La FDA en el 2017 reporto una serie de casos de alergia a los productos tópicos de gluconato de clorhexidina, uno de ellos causando la muerte. Por lo que es importante la investigación y la búsqueda de opciones naturales capaces de cumplir los efectos antisépticos deseados que causen menor cantidad de efectos adversos.

¿Es posible el uso de extracto de *Origanum vulgare* incorporado en un gl bioadhesivo que presente acción antimicrobiana y antibiofilm para el control microbiano en odontopediatría?

3.- JUSTIFICACIÓN

La caries dental es definida por la Organización Mundial de la Salud corresponde a una enfermedad infecciosa, transmisible, la cuál es producida por bacterias específicas en la cavidad oral. Desde hace algunos años, se le ha atribuido al *Streptococcus mutans* como el principal microorganismo de la caries dental entre otros *Streptococcus*. La manera correcta de tratar la caries es combatiendo la bacteria que la produce, se han descubierto sustancias incorporadas en diferentes productos de higiene oral que muestran buenos resultados como la clorhexidina, pero que a su vez causan efectos adversos en los pacientes, por este motivo se obtiene la opción de el uso de herbolaria en odontología.

Los extractos son compuestos complejos obtenidos de plantas o hierbas debido a sus grandes propiedades antimicrobianas, algunos aceites esenciales con mayor efecto antimicrobiano incluyen orégano, ajo, anís entre otros. Los extractos vegetales han sido utilizados desde hace mucho tiempo para diversas aplicaciones, pero investigaciones han demostrado que dichas plantas tienen diferentes propiedades y una de ellas es tener potente efecto antimicrobiano. Lo que se busca en este proyecto es evaluar la acción antimicrobiana y citotóxica del extracto natural de *Origanum vulgare* para incorporarlo en un gel bioadhesivo y así crear una alternativa efectiva y natural para el paciente pediátrico.

4.- HIPÓTESIS

Posible aplicación de *Origanum vulgare* incorporado en un gel bioadhesivo con condiciones óptimas y que mantenga propiedades antimicrobianas y antibiofilm contra microorganismos de interés odontológico.

5.- OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de *Origanum vulgare* y su incorporación en un gel bioadhesivo que mantenga los efectos antimicrobianos y antibiofilm contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* para su aplicación terapéutica en odontopediatría.

5.2 Objetivos específicos

- Obtener extracto etanólico de *Origanum vulgare* mediante técnica de maceración en frío.
- Realizar caracterización fitoquímica de forma preliminar del extracto obtenido por identificación parcial de compuestos presentes mediante reacciones coloridas.
- Evaluar actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos en agar mediante difusión en disco de método Kirby-Bauer contra cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.
- Identificar la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.
- Incorporar el extracto de *Origanum vulgare* en un gel bioadhesivo mediante los lineamientos que marca la PROFECO.
- Realizar análisis antibiofilm del extracto de *Origanum vulgare* incorporado en un gel bioadhesivo mediante un ensayo en una placa de 96 pozos.

6. ANTECEDENTES

6.1 Microbiota oral

la descripción de “animalculus” observados al microscopio en muestras de placa dental humana contribuyó a la investigación y al descubrimiento de la microbiología. Estos organismos que no se pueden ver al ojo humano al ser estudiados fueron considerados como flora normal o microbiota de la cavidad oral. La descripción de microbiota oral inicia en 1863 con Anton van Leewenhoek, el cual observó al microscopio a estos microorganismos de placa dental (Serrano *et al*, 2015).

La cavidad bucal se conforma de diferentes superficies, las cuales están recubiertas por una gran cantidad de bacterias, algunas de estas bacterias han sido fuertemente asociadas a la formación de caries dental y enfermedad periodontal, las cuales están dentro de las infecciones bacterianas más comunes en los humanos (Cruz *et al*, 2017).

Estudios han confirmado que los principales géneros bacterianos presentes en la cavidad oral son; *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacterias*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium*. Siendo los más frecuentes *Prevotella*, *Selenomonas* y *Streptococcus* (Serrano *et al*, 2015).

El *Streptococcus mutans* ha sido el más estudiado en investigaciones sobre caries dental, debido a su fuerte participación en esta enfermedad, sin embargo, hay otros microorganismos asociados a este proceso, como el *Streptococcus sobrinus* (Astorga *et al*, 2015)

6.2 Microorganismo del género *Streptococcus*

Los *Streptococcus* son descritos en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology como bacterias que forman células ovoides o esféricas, de menos de 2µm de diámetro, grampositivas, catalasas negativas, anaerobias facultativas, tienden a formar pares o cadenas, producen ácido láctico fermentando la glucosa, la mayoría de ellos crecen bien en medios enriquecidos con suero o carbohidratos a 35-37 °C (Montes y García, 2006).

Los *Streptococcus mutans* son bacterias con una diversidad genética, antigénica y bioquímica, las cuales fermentan el manitol y sorbitol, producen glucanos extracelulares a partir de la sacarosa, lo cual es esencial para la adherencia a la estructura dental. Su capacidad para adherirse y acumularse es el mayor factor de virulencia de esta especie (Rojas, 2014).

6.2.1 Clasificación de *Streptococcus*

- **Grupo piogénico:** principalmente formado por especies beta-hemolíticas, colonias grandes.
- **Grupo mitis:** incluye el patógeno neumococo (*S. pneumoniae*) y a otros *Streptococcus* habituales de la cavidad oral.
- **Grupo anginosus o milleri:** formado por especies que se pueden encontrar en la cavidad oral humana, tracto gastrointestinal y genital, son colonias de tamaño más pequeño y tienen un olor muy característico a caramelo.
- **Grupo salivarius:** contiene 3 especies que se relacionan con la cavidad oral humana; *S. vestibularis*, *S. salivarius* y *S. thermophilus*.
- **Grupo bovis:** contiene especies que principalmente se encuentran en el tracto intestinal de los animales.
- **Grupo mutans:** engloba 8 especies genéticamente diversas pero fenotípicamente similares relacionadas con la producción de caries dental.

6.3 *Streptococcus mutans*

En 1890, W. Miller, microbiólogo británico, propuso la teoría quimioparasitaria que explicaría el fenómeno de la caries dental, en la cuál se relacionaban microorganismos y carbohidratos en la dieta. En 1924, Kilian Clarke, microbiólogo británico también, aisló la bacteria *Streptococcus mutans* de lesiones cariosas y más tarde en el siglo XX investigaciones de National Institute of Health de Estados Unidos confirmaron las propiedades cariogénicas y la transmisibilidad del *S. mutans* (Garciano et al, 2012).

El *Streptococcus mutans* es un coco Gram positivo, en cadena, productor rápido de ácido láctico que tiene la capacidad de cambiar un medio de pH 7 a 4.2 en 24 horas. El hábitat natural del *Streptococcus mutans* es la cavidad oral (Ojeda et al, 2013).

Clarke en 1924 lo denominó *S. mutans* por las formas mutantes en que se presenta; cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido y coco (forma esférica) en un medio alcalino. El *S. mutans* es anaerobio facultativo, es decir utiliza oxígeno para su crecimiento, pero si el oxígeno no está presente puede sobrevivir de igual manera (Gamboa F, 2014).

6.3.1 Clasificación de *Streptococcus mutans*

- *Streptococcus mutans*
- *Streptococcus sobrinus*
- *Streptococcus macacae*
- *Streptococcus cricetus*
- *Streptococcus downei*

Taxonomía

Reino: *Bacteria*

Clase: *Bacilli*

Familia: *Streptococcaceae*

Género: *Streptococcus*

Especies: *S. mutans*

6.4 *Streptococcus sobrinus*

El *Streptococcus sobrinus* aparece en menor cantidad en la placa dental, sin embargo estudios han mencionado que esta altamente relacionado junto con *Streptococcus mutans* en el desarrollo de la caries dental (Fragkou *et al*, 2016).

El grupo de *Streptococcus mutans* se clasifica en dos grupos: *Streptococcus no viridans* y *Streptococcus viridans*, en el humano los principales serotipos son los c, e, f y g los cuales conforman las especies de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* (Arreguín *et al*, 2016).

6.4.1 Taxonomía

Reino: Bacteria

Clase: Bacilli

Familia: *Streptococcaceae*

Género: *Streptococcus*

Especies: *S. viridan*

6.5 Biofilm

El biofilm ha sido descrito como un ecosistema oral dinámico, complejo, formado por especies microbianas que forman comunidades, las cuales se establecen en diferentes nichos, con comunicación inter especies (Rojas y Echeverría, 2014).

La placa dental es definida como una comunidad bacteriana adherida fuertemente a la superficie dentaria, es organizada y adaptable al medio, activa, llena de microorganismos. La placa bacteriana contiene *Streptococcus* y *Actinomyces* entre otros, que producen un ambiente ácido fenómeno compatible con la desmineralización, si el consumo de carbohidratos es frecuente, este genera una adaptación de la bacteria produciendo un desequilibrio hacia la pérdida de minerales que conduce al inicio y progresión de la enfermedad caries dental (Astorga *et al*, 2015).

6.5.1 Clasificación de la placa dental

- Supragingival: contiene flora Gram positiva, asociada a microorganismos cariogénicos.
- Subgingival: compuesta en mayor cantidad por microorganismos anaerobios Gram negativos, son generalmente periodonto- patogénicos.

6.6 Caries dental

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define la caries como un proceso localizado de origen multifactorial, que inicia después de la erupción dentaria, reblandeciendo el tejido duro del diente hasta la formación de una cavidad si no es tratada a tiempo.

Núñez *et al* en el 2010 definieron la caries dental como un proceso o enfermedad crónica, resultado del metabolismo microbiano agregado sobre la superficie dentaria, resultando una pérdida mineral de la superficie. Es clasificada como una enfermedad transmisible y reversible.

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud sobre la carga mundial de morbilidad en el 2016, las enfermedades bucodentales afectan a la mitad de la población mundial (3,580 millones de personas) en donde la caries dental es el trastorno más prevalente. Es estimado que, en todo el mundo, 2,400 millones de personas padecen caries dental en dientes permanentes y 486 millones de niños sufren caries dental en dientes primarios (OMS, 2016).

La caries es una enfermedad multifactorial, asociando el consumo de carbohidratos, deficiente salud oral, huésped (saliva y dientes), la microflora (microorganismos) y el sustrato (dieta). La caries es considerada como la primera causa de consulta odontológica en todos los grupos de edad. Es la enfermedad crónica más frecuente en la especie humana, su progreso es lento en su mayoría, la progresión de la lesión puede presentarse desde la pérdida de minerales por presencia de ácidos a nivel estructural hasta la destrucción total del diente. El desarrollo de la caries la placa juega un rol primordial. (Astorga *et al*, 2015).

6.6.1 Caries de la infancia temprana

El termino caries de la infancia temprana fue utilizado en 1994, se define como la presencia de una o más lesiones cavitadas o no cavitadas, dientes ausentes por caries y obturaciones en cualquier diente temporal en niños menores a 71 meses de vida (5 años). Clínicamente se presenta con un patrón muy característico en donde varios dientes se involucran, la lesión progresa de manera muy rápida, las lesiones cariosas se presentan en su inicio en las superficies lisas de los dientes en el tercio gingival (Arango y Baena, 2004)

Tiene una prevalencia del 50% a los 2 años de edad, es un trastorno que afecta al infante desde la aparición del primer diente, según la OMS el 90% de la población infantil padece caries. Las lesiones cariosas comienzan en etapas tempranas de la vida, a los 5 años de edad el 76.2% de los niños presentan caries y el 42% presentará alguna lesión cariosa en su dentición permanente (Gutierrez *et al*, 2017)

6.6.2 Diagnóstico de caries dental

En la actualidad existen más de 29 metodos para el diagnóstico de caries a nivel mundial, entre los cuales estan; inspección visual con ICDAS, radiográfico y táctil, transiluminación, fluorescencia, exploración táctil con sonda, radiografía dígital, metodo de conductibilidad eléctrica entre otros (Cerón, 2015).

El metodo de inspección visual es el más comunmente utilizado por el odontólogo, debe de estar el diente limpio, libre de placa. Se debe utilizar siempre en conjunto con lo visual el método radiográfico debido a que clínicamente a menudo se subestiman lesiones profundas. Las radiografías permiten evaluar l progresión de la lesión, Pitts en 1990 afirmó la dificultad que existe en identificar lesiones que involucran téjido dentinario pormedio de la inspección visual por lo que el aconseja

el uso de radiografías interproximales siempre para complementar nuestro diagnóstico (Cueto, 2009).

6.6.3 Clasificación de caries dental

Según su localización

- Clase I: afectando caras oclusales de molares y premolares.
- Clase II: afectando caras proximales de molares y premolares.
- Clase III: afectando caras proximales de dientes anteriores sin afectar borde incisal.
- Clase IV: afectando caras proximales de dientes anteriores afectando borde incisal.
- Clase V: afectando tercio gingival de lingual o vestibular de anteriores y posteriores.

Según su nivel de desarrollo

- Grado I: caries en esmalte, asintomática
- Grado II: caries en esmalte y dentina.
- Grado III: caries afectando esmalte, dentina y pulpa pero aún esta vital.
- Grado IV: caries afectando pulpa la cuál ya ha sido afectada severamente.

6.6.4 Factores microbiológicos asociados a la caries

En el proceso de la caries, la placa dental o biofilm es un causante clave ya que es un microsistema de bacterias que tiene una gran capacidad de adherencia. Los microorganismos más asociados con el proceso de la caries dental es el grupo de *Streptococcus mutans* (Rojas y Echeverría, 2014).

6.7 Control de placa

El control de la placa dental consiste en la eliminación y la prevención de la acumulación sobre los dientes y las superficies gingivales adyacentes, su remoción es esencial para el mantenimiento de los tejidos orales sanos ya sean duros o blandos. El método del cepillado es el más utilizado, también existen elementos auxiliares como el uso de agentes antimicrobianos para complementar el control de esta (González et al, 2016).

De acuerdo a los Protocolos Odontológicos Salud Bucal 2014, la mejor manera de eliminarla placa dentobacteriana es la profilaxis dental, el cuñal es el procedimiento odontológico que remueve la placa dentobacteria ya sea blanda o mineralizada, para este procedimiento se utilizan ejuagatorio de clorhexidina al 0.2 o 0.12%, instrumentos de raspaje o de pulido. Este debe ser realizada cada 6 meses. Para mantener una buena salud es necesario el cepillado diario, uso de hilo dental y el uso de enjuagatorios (Ministerio de Salud Publica, 2014).

Antiséptico es definido como un agente químico utilizado en el control de microorganismos de la piel u otro tejido vivo, sin afectar a estos mismos (Diomedi *et al*, 2017).

6.7.1 Clorhexidina

Este antiséptico pertenece al grupo químico de las biguanidas, desarrollada en Inglaterra como un hallazgo en 1954, los estudios in vitro han revelado su gran capacidad antibacteriana y una muy baja toxicidad en mamíferos. Debido a esto es el antiséptico más recomendado para mucosas y uso odontológico. Su mecanismo de acción se debe a una absorción difusión pasiva a través de membranas celulares, la cuál es rápida tanto en bacterias Grampositivas (son las más sensibles) como en levaduras (Diomedi *et al*, 2017).

En la década de los 70 se demostró la capacidad de la clorhexidina para inhibir la formación de placa bacteriana, se reconoció como el agente antiplaca más efectivo y seguro hasta el momento (Puig et al, 2008).

En un ensayo clínico fue demostrado que la clorhexidina en pacientes con o sin caries presentes en la cavidad bucal, tiene la capacidad de reducir la placa dental.

6.8 Fitoterapia

El uso de compuestos naturales para controlar microorganismos, se encuentra cada vez más presente en la población, y esto es debido a los aceites esenciales líquidos, oleosos, aromáticos y volátiles extraídos de partes muy específicas de las plantas, los cuáles en su mayoría poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antioxidantes y biológicas.

Los fitofármacos, son definidos como productos o elaboraciones terapéuticas cuyos ingredientes activos están formados por partes de plantas u otro material de origen bruto o preparaciones vegetales, utilizados para prevenir, curar o atenuar algún estado patológico. La OMS estima que el 80% de la población utiliza medicinas herbarias tradicionales (Fuentes *et al*, 2016)

El empleo de plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde hace como mínimo 5000 años. La fitoterapia es el nombre que se le aplica al uso medicinal de las plantas, muchas de las especies naturales fueron utilizadas por antiguos egipcios, griegos y romanos por sus virtudes curativas. En el siglo II, Galeno, médico griego escribió una docena de textos de fitoterapia, los cuales fueron utilizados hasta la Revolución Científica en el siglo XIII y XIX con descubrimientos de la experimentación científica (Echegaray *et al*, 2011).

La medicina complementaria o medicina alternativa alude a un amplio conjunto de prácticas de atención de salud que no forman parte de la tradición ni la medicina convencional. Los productos de medicina alternativa incluyen hierbas, material herbario, preparaciones herbarias de los cuales se obtienen principios activos naturales y orgánicos. (OMS 2014-2023)

Muchas plantas y especias contienen aceites esenciales que son antimicrobianos: se menciona que cerca de 80 productos de origen vegetal contienen altos niveles de antimicrobianos con uso potencial en alimentos como el clavo, ajo, cebolla, salvia, romero, cilantro, perejil, oregano, mostaza y vainilla entre otros (Rodriguez 2011). La actividad biológica de una planta medicinal reside en uno o un conjunto de compuestos químicos que se encuentran en los tejidos de la planta, sus componentes antimicrobianos están contenidos en el aceite esencial presente en hojas, flores, bulbos, rizomas o frutos (Vega 2009).

6.8.1 Sustancias activas de la planta

Los metabolitos secundarios de las plantas cumplen una serie de funciones entre la planta y el ambiente, protegiéndolas de virus, hongos y bacterias. Son principios activos de medicamentos y otros productos. Estos metabolitos debido a sus propiedades han sido utilizados en la medicina, en la elaboración de fitofármacos.

Metabolitos principales:

- Alcaloides: contienen nitrógeno básico, son poco solubles en agua, reaccionan con ácidos. (Rojas *et al*, 2015)

Se clasifican de la siguiente manera:

- a) alcaloides derivados de la ornitina y la lisina.
 - b) Alcaloides derivados de la tirosina y la fenilalanina,
 - c) Alcaloides derivados del triptófano.
 - d) Alcaloides derivados del ácido nicotínico.; e) Alcaloides derivados de la histidina.
- Fenoles: la forma más común de encontrarlo en la naturaleza es en forma de glucósidos, son solubles en agua y solventes orgánicos. (Rojas *et al*, 2015)

Principales grupos de compuestos fenólicos:

- a) fenoles simples: poco frecuentes, en plantas en forma de heterósodios.
- b) Ácidos fenólicos: compuesto de un anillo fenólico y ácido carboxílico.
- c) Taninos: son bioactivos como antioxidantes y antimicrobianos, antisépticos y astringentes.
- d) Cumarinas: se incluyen dentro de los derivados fenólicos.
- e) Lignanos: poseen estructura constituida por dos unidades de fenilpropano.
- f) Quinonas: compuestos aromáticos con dos grupos cetona.
- g) Flavonoides: propiedades antialérgicas, antiulcéricas, antiinflamatoria, anti agregante plaquetario.

6.8.2 Preparación de las plantas

- Infusión: agua hirviendo que se añade sobre una planta fresca o seca. Extraemos aceites esenciales que son volátiles, por eso debe taparse.
- Decocción: se dejan las plantas en agua fría la cual después se pone a hervir a 100 durante 7 a 8 minutos (raíces, cortezas y frutos)
- Maceración: se dejan las plantas en agua, aceite, alcohol o vinagre y se deja macerar durante 12 horas a 15 días.
- Tintura simple: 1 parte de la planta seca por 5 partes de alcohol 20%.
- Tintura madre: 1 parte de planta fresca por 10 de alcohol 10%.
- Extracto: maceración de la planta en una solución hidro-alcohólica durante 6 días, centrifugar a 280 °C y se obtendrán los principios activos hidro o alcohol solubles.

6.9 *Origanum vulgare* (Orégano)

El *Origanum vulgare* (Orégano) constituye una de las plantas aromáticas más cultivadas en todo el mundo debido a su alta concentración de aceites esenciales (Skoufogianni *et al*, 2018). El orégano es una planta cultivada en varias regiones del mundo, cuyo valor

comercial se debe principalmente como especia, condimento y propiedades medicinales, la producción global es estimada en alrededor de 15,000 toneladas, siendo Turquía el principal exportador, seguido de México como segundo productor mundial, después Grecia y otros países (García et al, 2012) (García *et al*, 2012).

6.9.1 Características de *Origanum vulgare*

El *Origanum vulgare* es una planta herbácea, perenne y aromática, taxonómicamente tiene representa a la familia: *Lamiaceae*. El *Origanum vulgare* (Orégano) es una planta aromática originaria de Asia que contiene aceites esenciales cuyos metabolitos secundarios como carvacrol y timol tienen altos niveles de actividad antimicrobiana y antimicótica (Vollavidencio *et al*, 2016).

El aceite esencial del *Origanum vulgare* presenta actividades antioxidantes y antimicrobianas, debido a la presencia de carvacrol y timol. Estudios recientes informan que el aceite esencial de Orégano es antiproliferativo, antiinflamatorio, antidiabético y tiene actividad supresora del cáncer (Viana, 2019). El aceite esencial de *O. vulgare* es utilizado a nivel mundial como un material natural, medicinal y en productos para la salud, este aceite a parte de contener carvacrol y timon contiene terpinenos, alcohol, flavonoides, entre otros (Han *et al*, 2017).

6.9.2 Composición fitoquímica

Los compuestos de el aceite esencial de esta planta, como el carvacrol, timol y monoterpenos fenólicos presentan actividad antimicrobiana, se ha demostrado que el aceite de orégano es eficaz para aumentar la fluidez y la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando la pérdida del contenido celular y la lisis celular de microorganismos (Delgadillo *et al*, 2017).

El *Origanum vulgare* posee fitoquímicos que de acuerdo con su naturaleza, pueden clasificarse en tres categorías: compuestos volátiles, lípidos y fenólicos (García *et al*, 2012).

Compuestos volátiles

Son los principales responsables de las características sensoriales del orégano, su concentración modifica al olor y el sabor de las hojas. Dentro de estos compuestos estan; terpenos, sesquiterpenos, alcoholes y aldehidos (García *et al*, 2012).

Lípidos

Estudios han demostrado que el 7.8% de la parte lipídica la constituyen los lípidos no polares, como los esteroides, esteril-ésteres, alcoholes grasos, ácidos grasos libres, ceras y ácidos triterpénicos, el 1.9% esta conformado por glicoproteínas y fosfolípidos (García *et al*, 2012).

Compuestos fenólicos

En estudios se han encontrado los siguientes compuestos; ácido caféico, ácido rosmarínico, derivados del ácido hidroxibenzoico y derivados del ácido hidroxicinámico. Dentro del grupo de los compuestos fenólicos se incluyen flavonoides (García *et al*, 2012).

6.10 Método para obtención de extracto por maceración en frío

Los aceites esenciales y extractos de plantas son altamente utilizados y diversos estudios ha demostrado que la composición de extractos puede variar de acuerdo al método de extracción utilizado. En el método de extracción con disolventes, la muestra triturada y seca

se pone en contacto con disolventes como alcohol, cloroformo entre otros más (Luna *et al*, 2009).

El método de Soxhlet es utilizado para la obtención de fitosteroles, utilizando disolvente. Se debe añadir en un erlenmeyer disolvente junto con la especie a macerar, y dejarse en reposo tapado durante 7-9 días a temperatura ambiente para posteriormente filtrar y dejar evaporar el etanol en frasco tapado (Balcinde *et al*, 2005).

6.11 Método de evaluación in vitro de actividad antimicrobiana

En la actualidad existen diversos métodos para evaluar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos in vitro, las técnicas de difusión han sido altamente utilizadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana.

6.11.1 Método de difusión en disco (Método de Kirby-Bauer)

El método de difusión en agar está basada en el método originalmente descrito por Kirby-Bauer en 1973. Este método fue estandarizado y es actualmente recomendado por el comité de Ensayos de Suceptibilidad de NCCLS de Estados Unidos.

El método se basa en la relación de la concentración necesaria de la sustancia para inhibir una cepa bacteriana específica, en medir el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con el medio de cultivo adecuado para cada bacteria, la cuál ha sido sembrada y sobre la cuál se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnado con cierta cantidad de la sustancia (Rámirez y Marin, 2009)

6.11.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria por macrodilución

La actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa mediante variantes de los métodos de dilución, el método de la concentración bactericida mínima o concentración letal mínima, el cuál consiste en definir la concentración más baja del agente antimicrobiano-necesaria para matar el 99% del inóculo inicial después de su incubación por 24 horas bajo condiciones estandarizadas (Rámirez y Marin, 2009)

6.12 Métodos de caracterización fitoquímica

La fitoquímica es el estudio de los componentes químicos de las plantas, la técnica más común para obtener los principios activos es conocida como extracción, y tiene como finalidad la separación de la materia soluble de los tejidos vegetales por acción de un disolvente. Entre todos los métodos destaca el descrito por Domínguez en 1973, el cual es el tratamiento de los extractos con los agentes cromógenos, en el cual se detectan los principales tipos de metabolitos; alcoholes, alcaloides, flavonoides, compuestos carbonílicos, esteroides, indoles, ácidos grasos y azúcares (Flores, 2014)

6.13 Método de elaboración de gel bioadhesivo

Las formulaciones mucoadhesivas utilizan polímeros como el componente adhesivo. Estos polímeros lo que forman son líquidos viscosos y esto aumenta su tiempo de retención sobre las mucosas. Algunas características físicas y químicas que deben incluir son; hidrificación, flexibilidad, y propiedades viscoelásticas (Castán *et al*, 2014).

La Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) menciona que para la elaboración de un material gel necesario incorporar:

- Carbopol 940: Polímero de ácido acrílico, los 934, 940 y 941 son los más utilizados. Es un polvo blanco de olor acético, es ácido, pero al ser neutralizado con agua destilada amplía su espesor la proporción recomendada para elaboración de gel es de 20 ml de agua destilada por cada 2g. de Carbopol.
- Trietanolamina: es una amina terciaria viscosa, por sus dos grupos funcionales; amina y alcohol esta posee gran versatilidad para formar sales o jabones. Su uso principal es como emulsionante, tensoactivo y como un equilibrador de pH.

- Agua destilada: la destilación es un método de separación, donde se separan componentes líquidos de otra mezcla, se realiza para eliminar los contaminantes disueltos como sales.

6.14 Método actividad antibiofilm

El método de evaluación de actividad antibiofilm es realizada sobre placas de fondo plano de poliestireno de 96 pocillos, se coloca el medio con inóculo de bacteria, y se cultivan en presencia de las concentraciones subletales previamente determinadas. Se utilizan algunos pocillos sin extracto y sin inóculo de bacterias como control negativo, solo con medio y con etanol o agua destilada. Las placas se incuban a 37° durante 24/48 horas posterior a la incubación se retira el sobrenadante y se enjuagan para eliminar las células flotantes, se seca al aire durante 30 minutos y se deberá teñir la placa formada durante 15 minutos con solución acuosa al 0,1% de cristal violeta, 250µL

de etanol a cada pocillo, después 15 minutos de incubación y se medirá la absorbancia con un lector de microplacas a longitud de onda de 570 nm.

Se determinará la biopelícula con la fórmula $SBF = (AB - CW) / G$ (Sánchez *et al*, 2016).

- SBF: formación específica de la película
- AB: es el OD570 nm de las bacterias adheridas y teñidas.
- CW: OD570 nm de los pocillos de control teñidos que contienen solo bacterias sin el medio
- G: OD630 nm de crecimiento celular en caldo.

7. METODOLOGÍA

7.1 Obtención del extracto etanólico de *Origanum vulgare* mediante la técnica de maceración en frío.

Se realizó la obtención del extracto mediante la técnica de Soxhlet de extracción sólido-líquido (Adrianzén, 2018). Se utilizaron hojas secas de *Origanum vulgare* (Orégano) las cuales fueron adquiridas en una tienda de autoservicio especializado en la venta de dicho producto.



Figura 1. *Origanum vulgare* seco.

La extracción se llevó a cabo utilizando 76.98 g. de *Origanum vulgare* molido, se colocó en un matraz para posteriormente agregarle 400 ml. de etanol como solvente, se dejó macerar por 9 días a temperatura ambiente.



Figura 2. Incorporación de 400 ml de etanol



Figura 3. Maceración por 9 días

Filtrado

Una vez cumplidos los 9 días, se filtró colocándose en un frasco previamente estéril un embudo de plástico con papel filtro como barrera para la separación del extracto con los residuos sólidos.



Figura 4. Filtrado de extracto de *Origanum vulgare*

7.2 Caracterización fitoquímica parcial del extracto etanólico de *Origanum vulgare* mediante pruebas químicas.

Una vez que se obtuvo el extracto, se realizó su caracterización fitoquímica parcial por métodos químicos de identificación de grupos funcionales (Domínguez et al, 1973) los cuales son descritos en la Tabla 1. Las pruebas químicas de Liebermann Burchard, Hidróxido de sodio al 10%, Baljet y Ácido sulfúrico se realizaron en placa de porcelana con cavidades, las pruebas de Shinoda, Cloruro férrico, Molish y Dragendorff se realizaron en tubo de ensayo.

Tabla 1. Identificación de grupos químicos en *Origanum vulgare*

Prueba química	Metodología	Compuesto a identificar	Color prueba positiva
Liebermann Burchard	2 gotas del reactivo (una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1.0 mL de anhídrido acético y 1.0 mL de cloroformo)	Esteroles Triterpenos	Violeta-morado Rojiza
Shinoda	Limaduras de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico	Flavonoides Flavanonas Flavanonoles	Rojo Verde Violeta
Baljet	Solución A: 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol. Solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua.	Sesquiterpenlactonas	Naranja-rojo oscuro
Ácido sulfúrico	2 gotas de ácido sulfúrico concentrado	Quinonas	Rojo
Cloruro férrico	2 gotas de la solución de cloruro férrico en agua al 2.5%	Taninos	Oscuro
Molisch	3 gotas de reactivo (1g de alfa naftol en mL de etanol al 95% y se agita, se inclina el tubo y se depositan 2 mL de ácido de ácido sulfúrico concentrado por la pared.	Carbohidratos	Formación de anillo azul-verdoso en la interfase
Hidróxido de sodio	2 gotas de solución	Cumarinas	-

al 10%	acuosa o alcohólica dando un color amarillo o anaranjado que desaparece al agregar 2 gotas de HCL al 10%		
Dragendorff	Solución A: 0.85g de nitrato de bismuto, 10 mL ácido acético glacial y 40 mL de agua. Solución B: 8g de yoduro de potasio y 20 mL de agua.	Alcaloides	Rojo-naranja

7.3 Identificación de las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*

Para el estudio microbiológico, se activó la cepa *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, las cuáles me fue proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Odontología UANL. Este proceso de activación fue realizado de acuerdo con el Protocolo de Prácticas de Microbiología Experimental (UNAM, 2014). Fue iniciado el procedimiento en la campana de flujo laminar para evitar contaminación del medio ambiente. Se inoculó 100 µL de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en 1 mL. de caldo Trypticaseína de soya en un tubo eppendorf para cada bacteria, se colocaron en incubadora a 37°C durante 24 horas.



Figura 5. Esterilizado de aza a fuego directo

7.3.1 Sembrado por aislamiento

Se tomó una asada de inóculo de la cepa *Streptococcus mutans*, la cuál se inoculó previamente y se colocó en medio de cultivo agar Tripticaseína de soya. Se tomó el inóculo y se sembró en técnica de estría cerrada, se incubó a 37°C grados durante 24 horas. El mismo procedimiento fue realizado para la siembra de *Streptococcus sobrinus*.

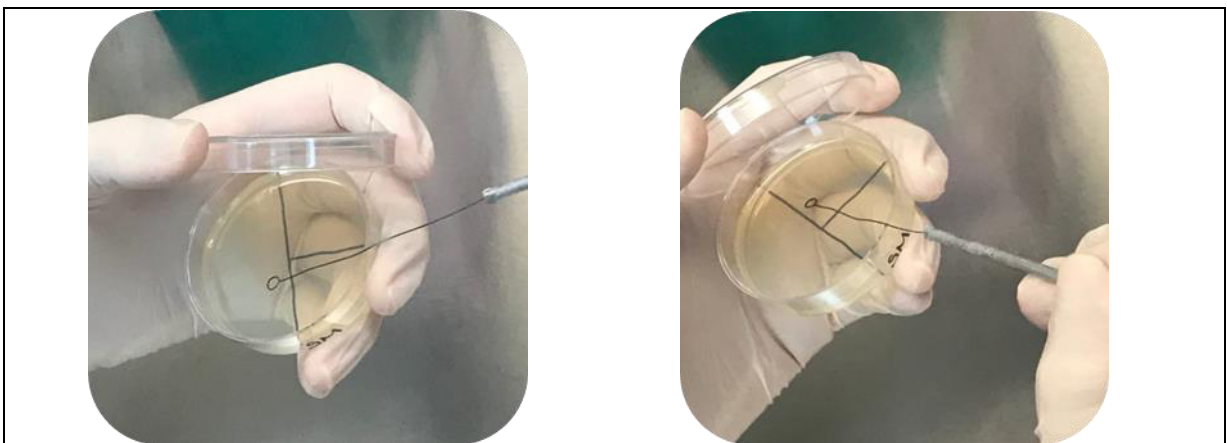


Figura 6. Sembrado de bacterias en técnica de estría cerrada

7.3.2 Tinción de Gram

Posteriormente se realizó la tinción de Gram para la identificación morfológica bajo microscopio de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* siguiendo la técnica de Hans Christian Gram descrita en 1880 (Rodríguez & Arenas, 2018). Se tomó una colonia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* del agar Trypticaseína de soya con un asa estéril y se colocó en un portaobjetos realizando un frotis con una asada de agua destilada para su correcta distribución, se fijó la muestra con calor del mechero y se realizó la tinción de Gram. Se realizó la tinción colocando por 1 minuto una gota de Cristal-violeta, se eliminó con agua a chorro indirecto, se colocó 1 gota de Yodo-lugol por 1 minuto y se enjuagó a chorro indirecto, se colocó Alcohol-acetona por 3 segundos y se enjuagó a chorro indirecto, por ultimo se colocó una gota de Safranina 1 min y se enjuagó a chorro, se secó por contacto y se llevó a microscopio para observación de las cepas.



Figura 7. Colorantes de la tinción Gram



Figura 8. Fijado de la muestra

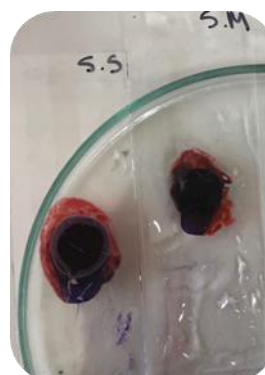


Figura 9. Tinción de la muestra

7.3.3 Preparación del inóculo

Se estandarizó la cantidad de colonias por mililitro (UFC) de manera cualitativa, se tomaron colonias del medio agar previamente sembrado con un asa estéril y se diluyeron en tubo con caldo Tripticaseína de Soya, se ajustó el inóculo a la turbidez del tubo 0.5 de la escala de McFarland equivalente a 1×10^6 UFC/mL.



Figura 10. Turbidez de 0.5 de la escala de McFarland

7.4 Determinación del efecto antimicrobiano del extracto de *Origanum vulgare* mediante diferenciación en agar contra sepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*.

Del inóculo estandarizado al 5 de la escala de McFarland de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, se vertió 100 mL de inóculo de cada bacteria en el centro de cada caja de agar Tripticaseína de soya, se distribuyó el inóculo con hisopo estéril mojado para un crecimiento confluyente, se dejó secar 3 minutos; después se realizó la técnica de difusión de disco según la metodología descrita por Kirby-Bauer, en cada caja de agar se colocaron con pinzas estériles discos de papel Whatman de 6 mm de diámetro los cuales fueron impregnados con las diluciones seriadas del extracto de *Origanum vulgare*, las concentraciones partieron de 2% - .02%, se compararon los resultados con los controles; agua destilada con etanol al 50/50 para control negativo y clorhexidina al 2% como control positivo. Se colocaron todos los discos y se dejaron secar por aproximadamente 30 minutos, posteriormente se incubaron invertidamente a 37° por 24 horas. (Bauer *et al*, 1966)

Se realizó la medición de halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio con la formula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\bar{X} \text{ Diámetro del halo del extracto}}{\bar{X} \text{ Diámetro halo control positivo}} \times 100$$

Los resultados se interpretaron de la siguiente manera; actividad inhibitoria alta >70%, actividad inhibitoria intermedia entre 50 y 70% y actividad inhibitoria baja cuando el resultado es <50% (Ramírez y Díaz, 2007).

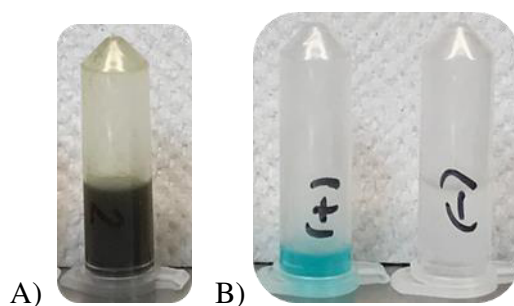


Figura 11. A) Extracto etanólico de *Origanum vulgare*; B) Control positivo (clorhexidina al 0.2% y control negativo (-) etanol.



Figura 12. Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)

7.5 Identificación de la concentración mínima inhibitoria *in vitro* del extracto etanólico de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*

Se realizó la identificación de la concentración mínima inhibitoria por el método de macrodilución de acuerdo con el protocolo de Clinical and laboratory Standrads Institute (Malbran, 2012).

7.5.1 Elaboración de concentraciones de extracto de *Origanum vulgare* para prueba mínima inhbitoria.

Se realizaron 7 concentraciones diferentes en tubos esteriles, partiendo de 2% de concentración que contiene 2mL de medio agua etanol al 50/50 y 2g de extracto de *Origanum vulgare*. Se iniciaron las diluciones agregando 1 mL de medio (agua/etanol) a cada uno de los 7 tubos, posteriormente se agregó 1 mL de extracto inicial y se colocó en el primer tubo el cual obtuvo una concentración de 2%, se tomó 1 ml del tubo de 2% y se colocó en el tubo el cual sería el 1% de concentración y asi sucecivamente hasta llegar a la concentración del séptimo tubo el cual fue .02%.

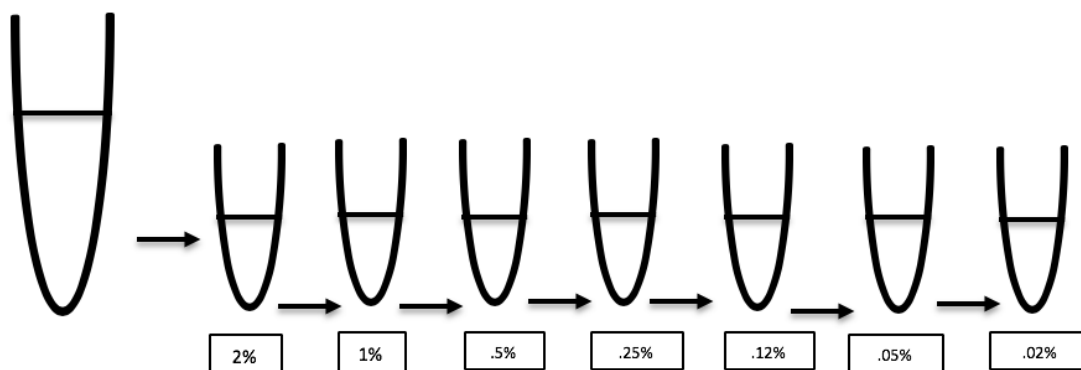


Figura 13. Elaboración de concentraciones para CMI

Se preparó el inóculo estandarizado de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, una vez obtenido la turbidez al 0,5 de McFarland fué sembrado en cajas de agar de tripticaseína de soya *Streptococcus mutans* en 4 cajas y *Streptococcus mutans* en otras 4 cajas.

Posteriormente se dividió cada caja en 4 para obtener un espacio por cada concentración a evaluar en ambas bacterias, desde 2% hasta 0.2% y se colocan 10µL de cada concentración en cada disco de 6 mm para colocarlo en el agar y evaluar los halos de inhibición de cada concentración después de 24 horas de incubación a 37°.

Una vez obtenido el resultado de la primera prueba se procedió a evaluar por segunda vez la mínima inhibitoria de cada bacteria, en tubos eppendorf se colocan 200 µL de medio líquido tripticaseína de soya, se agregó a cada tubo eppendorf 100 µL de inóculo de bacteria (en 5 tubos se colocó *Streptococcus mutans* y en 6 tubos se colocó *Streptococcus sobrinus*), se agrega 100 µL de cada concentración a los tubos eppendorf; para *Streptococcus mutans* se evaluó la concentración del 2%, 1%, .5%, .25% y .12% y para *Streptococcus sobrinus* se evaluaron las concentraciones de 2%, 1%, .5%, .25%, .12% y .05%. Se metió a incubadora a 37° por 24 horas. (Martínez, 2016)

Una vez pasadas las 24 horas se prepararon cajas de agar tripticaseína de soya 4 para *Streptococcus mutans* y 4 para *Streptococcus sobrinus*, se dividió las cajas en 3 y se colocaron discos con 10 µL de cada concentración a evaluar. Se colocaron las cajas en incubadora a 37° por 24 horas (Martínez, 2016).

7.5.2 Evaluación cualitativa de la concentración mínima inhibitoria por medio de la turbidez.

Aquí se buscó evaluar el grado de turbidez que presentaron los medios de cultivo inoculados con *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* expuestos al extracto de *Origanum vulgare* en sus diferentes concentraciones estudiadas (Sánchez, 2016).

Tabla 2. Evaluación cualitativa de la inhibición mediante la turbidez.

Indicador	Índices	
Grado de turbidez	0	Ausencia de turbidez en os cultivos de las cepas, inhbición al 100%
	1	Ligera turbidez del medio, inhibición del 75%
	2	Inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%
	3	Ligera inhibición, inhibición del 25%
	4	Sin inhibicion

7.6 Elaboración de gel bioadhesivo

Se elaboró el gel bioadhesivo de acuerdo a como lo marca la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO), se incorporó en un vaso:

- .5 gramos de Carbopol 940
- 500 µL de trietanolamina
- 50 ml de agua destilada
- 4 gramos de extracto de *Origanum vulgare*

Se colocó en vaso sobre estufa 50 ml. de agua destilada, se le incorporaron los .5 gramos de Carbopol y se dio agitación con barra magnetica hasta obtener una mezcla homogénea y más espesa, se adicionaron los 4 gramos de extracto de *Origanum vulgare* hasta que se

homogenizó, y se añadió poco a poco por goteo los 500 μ L de trietanolamina hasta lograr una consistencia gelificada.

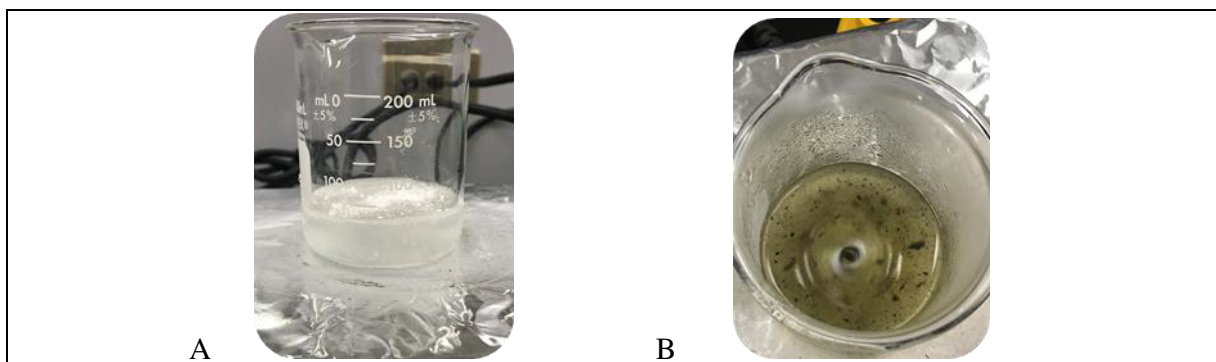


Figura 14. A) Agua destilada y Carbopol añadido; B) Extracto de *Origanum vulgare* en gel

7.6.1 Características de un gel ideal

- Actividad antimicrobiana: capaz de matar organismos Gram positivos o Gram negativos a bajas concentraciones.
- Solubilidad: debe ser soluble en agua u otros solventes en proporción necesario para un uso efectivo.
- Estabilidad: los cambios en sus propiedades deben ser mínimos en su almacenamiento, no deben tener pérdida de su acción germicida.
- No debe ser tóxico
- Homogeneidad: debe ser uniforme en composición, de manera que el o los ingredientes activos estén presentes en cada aplicación.

7.7 Evaluación antibiofilm de extracto etanólico de *Origanum vulgare* contra cultivo mixto de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

Se realizó la evaluación antibiofilm basado en el método de Palanisamy (Bojaca, 2016) de la siguiente manera; se inoculó *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en medio líquido de tripticaseína de soya para obtener un cultivo mixto, se incubó por 24 horas. Se utilizó una microplaca de poliestireno de 96 pozos, se colocaron 200 μ L del cultivo mixto en 36 pozos, y se incubó por 24 horas. Pasadas las 24 horas se eliminó con micropipeta el

contenido de los 36 pozos para colocarle a cada uno de los 36 pozos 200 μ L de caldo suplementado con glucosa al 0,125% para fortalecer el crecimiento del biofilm, se incubó por 24 horas. Se eliminó después de 24 horas el caldo de suplemento de glucosa con micropipeta y se colocaron los controles negativo (medio líquido) y positivo (clorhexidina 0.2%) y los tratamientos a evaluar de la siguiente manera; en los primeros 6 pozos de la fila A, se colocaron 200 μ L de medio solo para nuestro control de crecimiento, en los primeros 6 pozos de la fila B se colocaron 200 μ L de extracto etanólico de *Origanum vulgare* al 1%, en los primeros 6 pozos de la fila C se colocaron 200 μ L de clorhexidina al 0.2% como control positivo del extracto etanólico, en los primeros 6 pozos de la fila D se colocaron 200 μ L de gel sin tratamiento como control negativo, en los primeros 6 pozos de la fila E se colocaron 200 μ L de gel bioadhesivo de *Origanum vulgare* para evaluar su efecto antibiofilm, en los primeros 6 pozos de la fila F se colocaron 200 μ L de gel de clorhexidina al 2%. Se metió a incubar a 37° por 24 horas.

Pasadas las 24 horas se procedió a eliminar de cada pozo el contenido y se enjuagó colocando 200 μ L de agua destilada 3 veces en cada pozo con intención de eliminar todos los restos de tratamientos y controles positivos y negativos, una vez seca la placa se colocó 200 μ L de cristal violeta al 5% en cada uno de los 36 pozos por 10 minutos, posteriormente se eliminó el cristal violeta y se enjuago con agua destilada como anteriormente descrito y se colocó 200 μ L de etanol para disolver el exceso de tinción.

Una vez seca la placa se lleva a lectura a 600 nm, para lo cual se empleó el programa Gen5 de Epoch BioTek y se comparó la absorbancia observada del efecto del gel de *Origanum vulgare* con los controles.

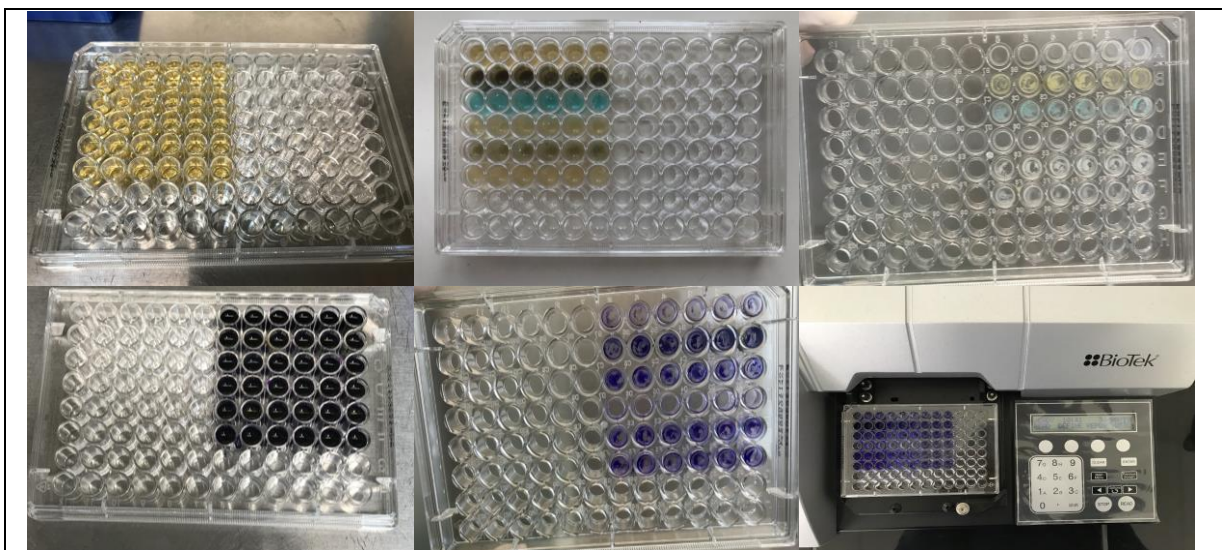


Figura 15. Evaluación antibiofilm de gel bioadhesivo y extracto etanólico de *Origanum vulgare* en microplaca de 96 pozos.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención de extracto etanólico de *Origanum vulgare*

Se realizó la obtención de los extractos etanólicos al 100% de hojas de *Origanum vulgare* seco, posterior a la filtración se obtuvo un extracto sin presencia de grumos, con condiciones optimas para sus ensayos con una tonalidad clara. Se dejó evaporar a temperatura ambiente hasta evaporar por completo el etanol, obteniendo un rendimiento de 4.46 g de extracto de los 74.98 g de *Origanum vulgare* iniciales.

Tabla 3. Rendimiento de extracto etanólico de *Origanum vulgare*

Planta	Peso inicial (g)	Rendimiento
<i>Origanum vulgare</i>	74.98 g	4 g

(g); gramos

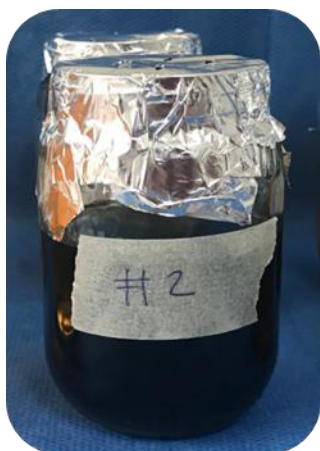


Figura 16. Extracto etanólico líquido de *O. vulgare*



Figura 17. 4 gramos de rendimiento



Figura 18. Rendimiento final de *O. vulgare*

8.2 Caracterización fitoquímica parcial

En la identificación de los grupos químicos mediante pruebas cromatográficas, el extracto etanólico de *Origanum vulgare* dió resultados positivos para; Liebermann Burchard, Shinoda, Baljet, Cloruro férrico y a Hidróxido de sodio al 10%.

Tabla 4. Caracterización fitoquímica parcial de *Origanum vulgare*

Prueba química	Compuesto a identificar	Resultado
Liebermann Burchard	Esteroles Triterpenos	+
Shinoda	Flavonoides Flavanonas Flavanonoles	+
Baljet	Sesquiterpenlactonas	+
Ácido sulfúrico	Quinonas	-
Cloruro férrico	Taninos	+
Molisch	Carbohidratos	-
Hidróxido de sodio al 10%	Cumarinas	+
Dragendorff	Alcaloides	-

Presencia de sustancias activas (+), prueba negativa (-)

8.3 Identificación de las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*

Una vez aislado el inóculo de ambas bacterias; *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* y una vez incubado a 37° por 24 horas se pudo observar de manera macroscópica el crecimiento de colonias ambas bacterias sobre el agar.

En cuanto a la identificación microscópica con aumento de 40x y 100x, se pudo ver claramente la cepa de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* con una tinción de color violeta, lo que deja claro que son bacterias Grampositivas. Se pudieron observar los cocos en cadena, en pares y aislados.

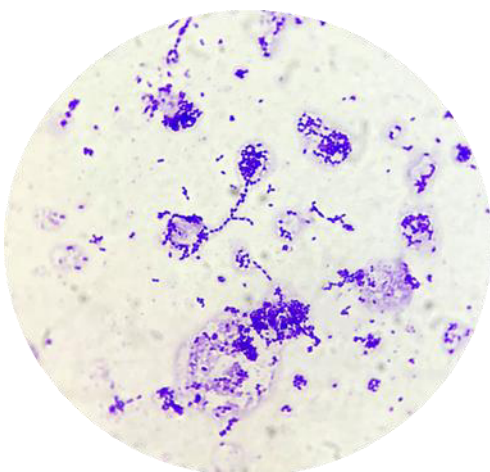


Figura 19. *Streptococcus mutans* 100x

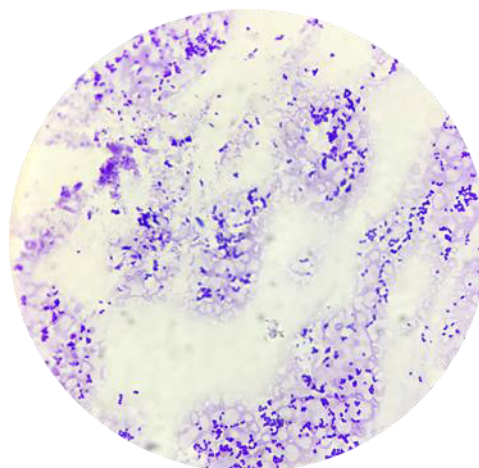


Figura 20. *Streptococcus sobrinus* 100x

8.4 Efecto antimicrobiano de extracto etanólico de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

En este estudio se logró identificar el efecto antimicrobiano de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* ya que se obtuvieron halos de inhibición promedio de 29 mm a la concentración de 2% y de 19 mm a la concentración de .2% en comparación con el control positivo (clorhexidina al 2%) con halo de inhibición de 15mm.

El extracto de *Origanum vulgare* también demostró tener efecto antimicrobiano contra *Streptococcus sobrinus*, obteniéndose halos de inhibición de 24 mm.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana contra *S. mutans* (ATCC)

Tratamiento		Halos de inhibición (mm)				
		1	2	3	$\bar{X} \pm s$	%
Extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> (ng/mL)	2%	26	29	25	26 ± 1.6	173
	1%	24	19	22	21 ± 2	140
	.5%	20	18	18	18 ± 0.94	120
	.25%	19	13	16	16 ± 2.4	106
	.12%	0	0	0	0	0
	.05%	0	0	0	0	0
	.02%	0	0	0	0	0
+ -		15	15	15	15 ± 0	100
		0	0	0	0	0

Promedio de la muestra \bar{X} ; desviación estándar de la muestra (s); porcentaje del efecto inhibitorio de la muestra (%); clorhexidina 2% (C+); etanol (C-)

Tabla 6. Actividad antimicrobiana contra *S. sobrinus* (ATCC)

Tratamiento		Halos de inhibición (mm)				
		1	2	3	$\bar{X} \pm s$	%
Extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> (ng/mL)	2%	24	13	20	19 ± 4	126
	1%	21	16	20	19 ± 2.1	126
	.5%	17	20	16	17.6 ± 1.6	117
	.25%	17	18	18	17.6 ± 0.4	117
	.12%	14	15	14	0	0
	.05%	0	0	0	0	0
	.02%	0	0	0	0	0
+ -		15	15	15	15 ± 0	100
		0	0	0	0	0

Promedio de la muestra \bar{X} ; desviación estándar de la muestra (s); porcentaje del efecto inhibitorio de la muestra (%); clorhexidina 2% (C+); etanol (C-).

8.5 Concentración mínima inhbitoria del extacto etanolico de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* (ATCC)

8.5.1 Elaboración de concentraciones de extracto de *Origanum vulgare* para prueba mínima inhbitoria.

Se realizaron 7 concentraciones diferentes en tubos esteriles, partiendo de 2% de concentración que contiene 2mL de medio agua etanol al 50/50 y 2g de extracto de *Origanum vulgare*. Se iniciaron las diluciones agregando 2 mL de medio líquido tripticaseína de soya a cada uno de los 7 tubos, posteriormente se agregó 1 mL de extracto inicial y se coloco en el primer tubo el cual obtuvo una concentración de 2%, se tomó 1 ml del tubo de 2% y se coloco en el tubo el cual sería el 1% de concentración y así sucecivamente hasta llegar a la concentración del séptimo tubo el cual fue .02%.

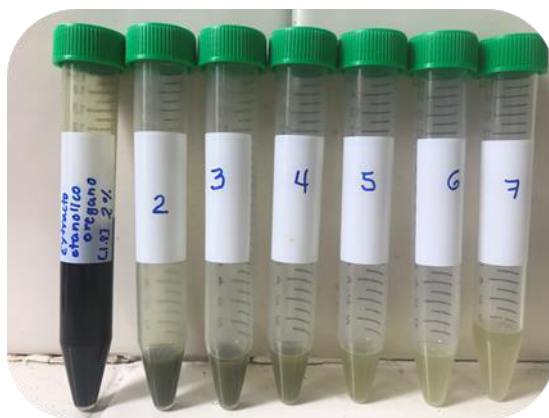


Figura 21. Diluciones de extracto; 1: 2%, 2: 1%, 3: .5%, 4: .25%, 5: .12%, 6: .05%, 7: .02%.

8.5.2 Prueba de Concentración Mínima Inhibitoria por método de macrodilución

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria de extracto etanólico de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* (ATCC) y *Streptococcus sobrinus* (ATCC) manera cuantitativa.

Microorganismo	Concentración del extracto etanólico de <i>Origanum vulgare</i> (%)								
	2%	1%	.5%	.25%	.12%	.05%	.02%	C+	C-
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC)	26	24	20	19	0	0	0	15	0
<i>Streptococcus sobrinus</i> (ATCC)	24	21	17	17	0	0	0	15	0

Porcentaje del efecto inhibitorio de la muestra (%); clorhexidina 2% (C+); etanol (C-).

Tabla 8. Evaluación de concentración mínima inhibitoria de manera cualitativa mediante turbidez

Concentraciones de extracto (%)									
	2%	1%	.5%	.25%	.12%	.05%	.02%	C+	C-
<i>Streptococcus mutans</i>	0	0	0	0	3	4	4	0	4
<i>Streptococcus sobrinus</i>	0	0	0	0	3	4	4	0	4

Porcentaje inhibitorio de la muestra (%); Clorhexidina 0.2% (C+); etanol (C-).

8.6 Elaboración de gel bioadhesivo con extracto de *Origanum vulgare*

La concentración final de el gel fue de 2%, se obtuvo un gel homogéneo, soluble en agua, estable debido a que no hay cambio en sus propiedades al momento de su almacenamiento, no es tóxico para los humanos ni animales, con capacidad antimicrobiana capaz de matar organismos grampositivos a una concentración de 2%.

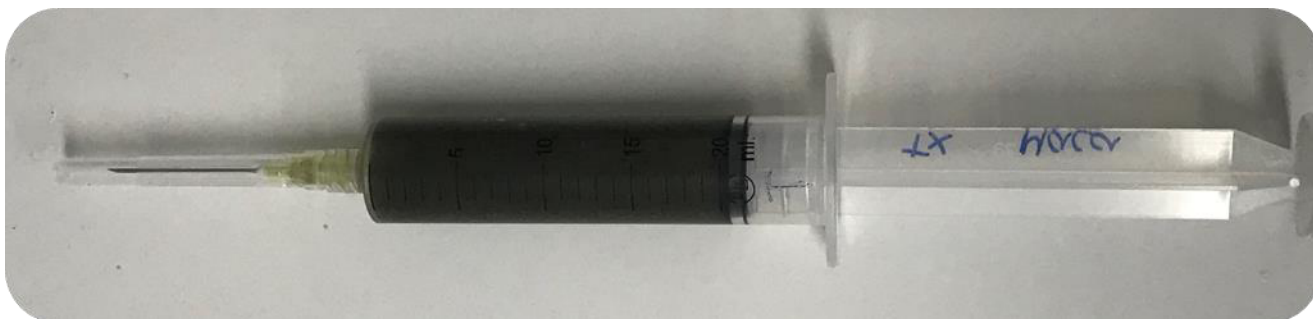


Figura 22. Gel bioadhesivo de *Origanum vulgare*

8.7 Efecto antibiofilm de *Origanum vulgare*

Basados en los resultados previos de la actividad antibacteriana del extracto de *Origanum vulgare*, se exploró la inhibición de la formación de biofilm sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Los resultados de la actividad antibiofilm obtenidos mostraron que el gel bioadhesivo de *Origanum vulgare* al 2%, redujo el biofilm de *S. mutans* y *S. sobrinus* en un 61% a las 24 horas y el control positivo gel de clorhexidina al 2% redujo el biofilm contra los mismos microorganismos en un 55%.

Tabla 9. Absorbancia a 600nm

Absorbancia	Absorbancia	%
Control	0.56	100
Extracto <i>Origanum vulgare</i>	0.495333	11.55
Clorhexidina 0.2%	0.246667	55.95
Gel control -	0.45	19.64
Gel <i>Origanum vulgare</i>	0.123	61.97
Gel clorhexidina 2%	0.260667	53.45

Gráfico 1. Actividad antibiofilm de extracto etanólico de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, los resultados son expresados como el promedio del triplicado de experimentos individuales realizados.

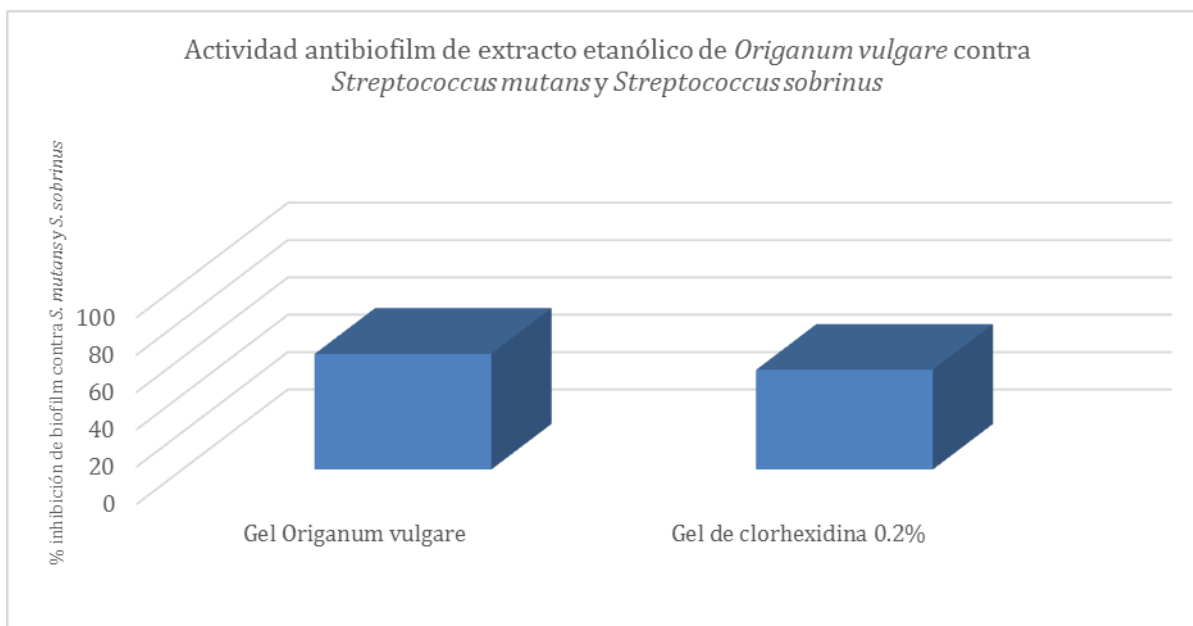
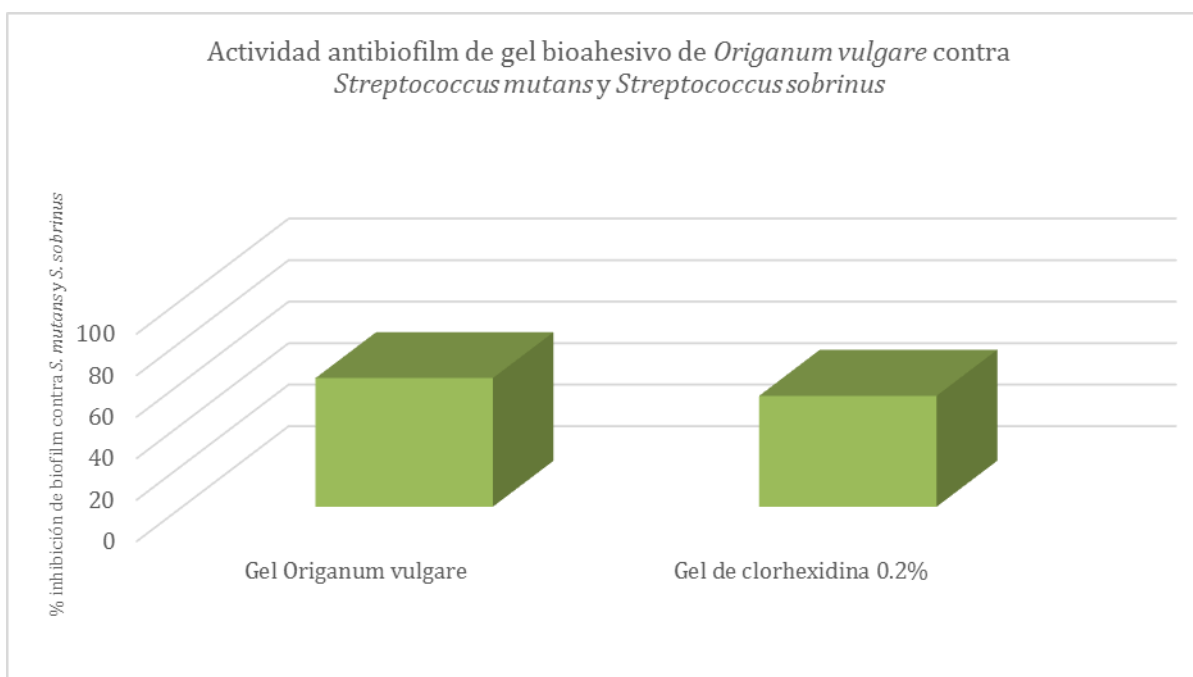


Gráfico 2. Actividad antibiofilm de extracto etanólico de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, los resultados son expresados como el promedio del triplicado de experimentos individuales realizados.



9. DISCUSIÓN

Se realizó el extracto acuoso de *Origanum vulgare* y se evidenció la presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, aceites esenciales en los extractos etanólicos mediante una caracterización fitoquímica, estudio realizado por Salazar *et al* (2019) mostró que el extracto etanólico no presentó flavonoides, pero concordó en la presencia de alcaloides en la caracterización fitoquímica. De acuerdo a nuestro estudio, el extracto etanólico de *Origanum vulgare* en la caracterización fitoquímica demostró tener presencia de esteroides, terpenos, flavonoides, flavonoides, flavonoides, flavonoides, flavonoides, sesquiterpenoides, taninos y cumarinas.

El agar Mueller Hinton demostró ser de todos los medios disponibles, el mejor para las pruebas de sensibilidad bacteriana debido a su buena reproducibilidad, baja cantidad de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas. Permite buen crecimiento de la mayoría de los patógenos de acuerdo con Malbrán (2012) En nuestro estudio se realizaron las pruebas de sensibilidad en cajas de agar Mueller Hinton, se pudo observar un correcto crecimiento en todas las cajas, hubo una buena reproducibilidad, es decir al igual que el artículo mencionado anteriormente corroboramos que el agar Mueller Hinton es una excelente opción para estos estudios.

La caracterización fitoquímica parcial realizada por métodos químicos reportó la presencia de esteroides, triterpenos, sesquiterpenoides, taninos, flavonoides y cumarinas en *Origanum vulgare*, este resultado concuerda con García *et al* (2012) quienes reportan la presencia de compuestos volátiles como lo son los terpenos y sesquiterpenoides, compuestos lipídicos como esteroides, compuestos fenólicos como flavonoides en *Origanum vulgare*, sin embargo este resultado difiere de algunos estudios como el publicado por Acosta *et al* (2017) donde mencionan presencia de otras sustancias activas en extracto acuoso de *Origanum vulgare* como catequinas, antocianinas, ácido gálico y donde se reportó presencia negativa de terpenos y flavonoides, el resultado pudo haber diferido del nuestro debido a que se realizaron las pruebas con un extracto acuoso de *Origanum vulgare* y no etanólico como en nuestro estudio, por otro lado en otro estudio realizado por Torrenegra *et al* (2015), utilizando el método de cromatografía de gases se encontraron los siguientes compuestos

timol, carvacrol, cariofileno, monoterpenos, sesquiterpenos, lo cual coincide con los compuestos encontrados en nuestro estudio.

Por otro lado, la prueba de sensibilidad antimicrobiana realizada por el método de difusión de disco de Kirby-Bauer mostró que el extracto etanólico de *Origanum vulgare* si presenta actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* a distintas concentraciones, siendo al 2% la que demostró tener un mejor resultado con halos de inhibición de 26 y 24 mm. Tres investigaciones han demostrado que el aceite esencial de *Origanum vulgare* tienen un buen efecto antimicrobiano y antifúngico según reportado por Pimentel *et al* (2015), de acuerdo con lo encontrado en los resultados de nuestro estudio, efectivamente se obtuvo un efecto antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* 80% y *Streptococcus sobrinus* 75%, realizaron un estudio de extracto etanólico de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* y en sus resultados en relación con la lectura del halo de inhibición (mm), se observó que a partir del primer tratamiento hay una reacción de inhibición, dando un promedio final del halo de inhibición de 26 mm, lo cual concuerda con el promedio de halos de inhibición en nuestro estudio contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

Posteriormente se determinó la concentración mínima inhibitoria por medio de macrodilución, se preparó extracto de *Origanum vulgare*, posteriormente este fué diluido a diferentes concentraciones (5%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100%) con agua destilada estéril al igual que Shovelin & Muñoz (2018), los cuales obtuvieron un resultado de concentración mínima inhibitoria en la concentración de 20%, a diferencia de nuestro estudio en donde se obtuvo una concentración mínima inhibitoria a una concentración del 40% con halos de inhibición promedio de 16 mm.

Se determino la prueba antibiofilm de acuerdo al artículo reportado por Veloz *et al* (2015) y Semiz *et al* (2018) cuantificando el crecimiento de la biopelícula mediante un ensayo de tinción con cristal violeta, incubando primero el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* por 24 horas en microplacas de 96 pocillos, tiñiendo las células con cristal violeta posteriormente lavandolo tres veces para al final agregar etanol al 95% para solubilizar el

cristal violeta retenido midiendo la densidad óptica a 590 nm, la única diferencia de nuestro estudio es que fue medida la densidad óptica a 600 nm, no se encontro artículo reciente de estudio antibiofilm de extracto de *Origanum vulgare* contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

10. CONCLUSIONES

- De acuerdo al estudio experimental realizado, el extracto etanólico de *Origanum vulgare* agregado al gel bioadhesivo si mostró un porcentaje de inhibición alto contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* a una concentración de 2% con un 183% de inhibición para ambas bacterias, este resultado asociado a las sustancias químicas activas de esta planta; esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos y cumarinas.
- En este estudio se comprobó que una concentración de *Origanum vulgare* al .25% es capaz de inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.
- En cuanto a la prueba antibiofilm, el gel bioadhesivo de *Origanum vulgare* al 2%, redujo el biofilm de *S. mutans* y *S. sobrinus* en un 61%, obteniendo un mejor resultado que el control positivo gel de clorhexidina al 2% el cual redujo el biofilm contra los mismos microorganismos en un 55%.
- El beneficio de los resultados de este estudio es importante, ya que es un gran avance a la investigación acerca de productos naturales que tengan compuestos medicinales capaces de producir efecto antimicrobiano disminuyendo el riesgo de efectos adversos.
- Se sugiere dar continuidad a este estudio con la propuesta de emplear este gel bioadhesivo de *Origanum vulgare* en cavidad oral de pacientes pediátricos con el fin disminuir la carga bacteriana en pacientes con alto riesgo de caries.

11. LITERATURA CITADA

- Acosta L, Lizaraso A, Kristy Y. Caracterización y obtención de preservantes microencapsulados a partir de extractos acuosos de Orégano (*Origanum vulgare*), chincho (*Tagetes elliptica*) y Acedera (*Rumex crispus*). Lima; Universidad San Ignacio de Loyola. 2017
- Adrianzén M, Alvarado L. Influencia del método de extracción soxhlet y reflujo en la acción reductora del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum*. Perú: Universidad Nacional de Trujillo. 2018.
- Arango M, Baena G. Caries de la infancia temprana y factores de riesgo. Revisión de la literatura. *Rev. Estoma.* (2004);12(1): 59-65.
- Ardila M, Vargas A, Pérez J, Mejía L. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*,
- Arreguín J, Ríos C, Hernández C, Ostia M, Ventura J, Álvarez C, González Z, Gutiérrez G. Caries dental y microorganismos asociados a la caries en la saliva de los alumnos del primer año de la Facultad de Odontología, UNAM. *Rev. Odont. Mex.* (2016);20(2).
- Astorga B, Barraza C, Casals J, Cisterna M, Mena D, Morales F, González S, Junior O, Moncada G. Avances en el estudio de la diversidad bacteriana oral asociada a caries dental mediante el estudio genómico. *Int J Odontostomat.* (2015);9(3): 349-356.

- Rosemarinus officinalis Thymus vulgaris frente a Clostridium perfringens. (2009) 8:47-57
- Balcinde Y, Hung B, Marrero A, Tirado S, Pérez C, Falero A, Martí E, Águila B, Fonseca M, Lightbourne E. Comparación de diferentes métodos de extracción para la obtención de una fracción rica en fitosteroles a partir de la cachaza de caña de azúcar. Rev Cenic Cienc Quím. 2005; 36(1): 6-8.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Tenckhoff M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966; 45(4):493-496.
- Bender D, Barcenas M. El ajo y sus aplicaciones en la conservación de alimentos. (2013); 25-36
- Brochot, A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C. Antibacterial, antifungal, and antiviral of three essential oil blends. (2017); 6(4).
- Castán H, Ruíz M, Clares B, Morales M. Design, development and characterization of buccal bioadhesive films of Doxepin for treatment of odontalgia. Drug Deliv. 2014; 22(6).
- Castro L, Moran M. Propuesta de una formulación de alcohol gel y su respectivo procedimiento de registro. (2011)
- Cerón B. El sistema ICDAS como método complementario para el diagnóstico de caries dental. Rev. CES. Odonto. (2015); 28(2): 100-109.
- Cruz S, Díaz P, Arias S, Mazón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev Cuba Estomatol. (2017); 54(1).
- Cueto V. Diagnóstico y tratamiento de lesiones cariosas incipientes en caras oclusales.

- Curull C, Arias M. Dentífricos, geles y colutorios ¿por qué y para que? (2001); 11(1):61-70.
- Chalar L, Moya J, Vargas E, Rebollo M, Romero B. Funcion antimicrobiana de la alicina de ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. (2014); 17: 26-28
- Delgadillo L, Bañuelos R, Delgadillo O, Silva M, Gallegos p. Composición química y efecto antibacteriano *in vitro* de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. Nova Scientia. 2017; 9(19).
- Del Puerto M, Perez J, Perdomo J, Castro E, Casas L. Homeopatía y estomatitis aftosa recurrente. Revision bibliografica (2011); 33(2): 220-224.
- Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao I, Medel M, Quintanilla M, Riedel G, Tinoco J, Cifuentes M. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. Rev Chilena Infectol. 2017; 34(2): 156-174.
- Echegaray J, Echegaray P, Mosquera A, Gerrikaetxebarria J. Fitoterapia y sus aplicaciones. (2011); 22(6): 258-267.
- Fragkou S, Balasouili C, Tsuzukibash O, Argyropoulou A, Menexes G, Kotsanos N, Kalfas S. Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus and Candida albicans in oral samples from caries-free and caries-active children. Eur Arch Paediatr Dent. (2016)
- Fuentes F, Faúndez F, Roa I. Fitoterapias en lesiones de mucosa oral: propiedades reparativas y aplicación clínica. Revisión sistemática de la literatura. Int J. Odontostomat. (2016); 10(3): 539-545.

- Flores V, Castañeda O, Montiel T, Hernández G. Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphyllacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Inv Cien Unive Auto Aguasc.* 2014; 63:18-23.
- García E, Castro F, Gutiérrez J, García S. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Rev Mex de Cienci Agri.* 2012; 3(2): 339-353.
- González B, Ramírez E, Herrera M, Mattia M, Mora O, Ramírez Y. Efectividad de los tratamientos para el control de la placa dental. Revisión sistemática. *Rev Venez Invest Odont.* 2016;4(2): 330-352.
- González R, Cardentey J. La medicina herbolaria como terapéutica en un consultorio. *Rev. Cienc. Med. de Pinar del Rio.* (2016): 20(2):182-187.
- Graciano M, Correa Y, Martínez C, Burgos A, Ceballos J, Sánchez L. *Streptococcus mutans* y caries dental en América latina. Revisión sistemática de la literatura. *Rev Nac Odonto.* 2012; 8(14): 33-45.
- Gutiérrez N, Moreno X, Hernández K, Isidro L, Guzmán C. Nivel de conocimiento de salud bucal de padres y/o cuidadores y el estado de salud bucal de lactantes. *Rev Tamé.* 2017; 6(17): 612-614.
- Han F, Ma G, Yang M, Yan L, Ji-cheng S, zHI-DONG z, Han.lin X. Chemical composition and antioxidant activities od essential oils from different parts of the oregano. *Journal of Zhejiang Univ.* 2017;(18)1:79-84.
- Jara A. Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Piper imperiale* (Piperaceae). (2013): 30-35.

- Liu Q, Meng X, Li Y, Zhao CN, Li HB. Antibacterial and antifungal activities of spices. 2017; 18(6).
- Malbran C. Metodo de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. MIC testing. 2012; 32(2).
- Martínez L. Detección de microorganismos multirresistentes. Rev Méd. Valdecilla. 2016;1(1):17-25.
- Ministerio de salud del Perú Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. 2002.
- Ministerio de Salud Pública. Protocolos odontológicos. 1.a ed. Quito: Programa Nacional de Genética y Dirección Nacional de Normatización, 2013. Disponible en: <http://salud.gob.ec>.
- Molina N, Durán D, Castañeda E, Juárez-López M. La caries y su relación con la higiene oral en preescolares mexicanos. Gac Med Mex. 2015; 151: 485-490.
- Montes M, García J. Género *Streptococcus*: una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. Enferm Infecc Microbiol clin. 2007; 24(3): 14-20.
- Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *Streptococcus mutans* y caries dental. Rev CES Odonto. 2013; 26(1): 44-56
- Peredo H, Palou E, García A, López A. Aceites esenciales: métodos de extracción. 2009: 24-32.
- Pinto J, Chávez D, Navarrete C. Salud bucal en el primer año de vida. Revisión de la literatura y protocolo de atención odontológica al bebé. Odus Cient. 2018; 19(1):60-72.

- Procurduría Federal del Consumidor. Rev. Del. Consumidor. Gel antibacterial (alcohol en gel). Disponible en: <http://computacion.cs.cinvestav.mx>.
- Puig M, Montiel J, Almerich J. Uso de los barnices de clorhexidina en la prevención y el tratamiento de la enfermedad periodontal. Una revisión bibliográfica. 208;1(2): 103-109.
- Ramírez L, Marin D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica. 2009;19(42): 263-268.
- Ramírez H, Narcedalia L, Martínez E. Efectos terapéuticos del ajo (*Allium sativum*). 2016; 3: 39-47.
- Rodríguez E. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. 2011; 7: 153-170
- Rodríguez P, Arenas R. Hans Christian Gram y su tinción. Derma. Cosme. Méd. Quirúrgica. 2018; 16(2): 166-167.
- Rojas L, Jaramillo C, Lemus M. Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. 1 ed. Ecuador: UTMACH 2015.
- Rojas S, Echeverría S. Caries temprana de la infancia ¿enfermedad infecciosa? Rev. Med. Clin. Condes. 2014; 24(3): 581-587.
- Salazar I, Rodríguez R, Betancourt C, Martínez Y, Guillaume J. Análisis de los metabolitos secundarios del polvo de hojas de *Origanum vulgare* y *Ficus pandurata*. Rev Prod Anim. (2019); 31(1): 61-63.
- Sánchez S. Actividad antibacteriana *In vitro* del extracto hidroalcoholico de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (Paico) por el método de macrodilución en caldo frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. 2016.

- Serrano H, Sánchez M, Cardona N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. Rev CES Odonto. 2015; 28(2): 112-118.
- SIVEPAB Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales.
- Skoufogianni E, Solmou A, Danalatos N. Ecology, cultivation and utilization of aromatic Greek Oregano (*Origanum vulgare* L.): A review. 2019;47(3): 546-552.
- Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Biología. Protocolo de prácticas microbiología experimental. 1.a ed. 2014. Disponible en <http://depa.fquim.unam.mx> .
- U.S Food and Drug Administration. La FDA advierte acerca de reacciones alérgicas poco comunes pero graves del antiséptico tópico con gluconato de clorhexidina. 2017.
- Veloz JJ, Saavedra N, Lillo A, Alvear M, Barrientos L, Salazar. Antibiofilm activity of Chilean Propolis on *Streptococcus mutans* is influenced by the year of collection. BioMed Resear Intern. 2015; 2015: 1-6.
- Viana T, Castro C, Lima J, Ramos T, Nunes I, Machinski M, Graton J, Alves B. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. Indu Crops & Prod. 2019; 129: 345-349.
- Villavidencio J, Horomi H, Salcedo D, Pineda-Mejía M, Ramos D, Zambrano L, Martínez E, Mendoza G, Petkova-Gueorguieva M, Bardales R. Efecto antimicótico *in vitro* de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Cándida albicans*. Odontol Sanmarquina. 2016;19(20):5-8.

12. PRODUCTOS GENERADOS

- Asistencia y ponencia en el XVI Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia, León Guanajuato 2019.
- Presentación de tesis